(Aus dem chemischen Laboratorium des physiologischen Instituts
der Universität Breslau.)

Beiträge zur Kenntniss

des

Caseïns der Frauenmilch.

Inaugural-Dissertation

welche

nebst den beigefügten Thesen

mit Genehmigung der

Medicinischen Facultät der königl. Universität Breslau

zur

Erlangung der Doctorwürde

in der

Medicin und Chirurgie

am 22. März 1900 vormittags 11 Uhr

in dem Musiksaale der Kgl. Universität

öffentlich vertheidigen wird

Erwin Kobrak
aus Breslau,
Assistent am königl. hygieinischen Institut.

ACAD.
MED. BAT
BIBL.

Opponenten:
Dr. d. **Franz Steinitz,** Arzt,
Cand. med. **Ernst Gottstein.**

Breslau 1900.

Genehmigt zum Druck auf Antrag des Referenten Herrn Prof. Dr. Hürthle.

C. Hasse,
Prodecan.

Meinen lieben Eltern.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546309_0058

Die charakteristischen Eigenschaften, durch welche sich die Frauenmilch von der Kuhmilch unterscheidet, werden bekanntlich theils auf Verschiedenheiten des Caseïns, theils auf Verschiedenheiten des Mischungsverhältnisses zurückgeführt, in welchem sich das Caseïn neben den anderen Bestandtheilen in beiden Milcharten befindet.

Die Entscheidung der Frage, ob das Caseïn der Kuh- und Frauenmilch identisch ist, hat ebensowohl praktische wie theoretische Bedeutung. Denn auf der einen Seite ist eine rationelle künstliche Ernährung des menschlichen Säuglings nicht eher möglich, ehe nicht die Eigenschaften der Frauenmilch in allen ihren Einzelheiten genau festgestellt sind, auf der anderen Seite ist es für den vergleichenden Physiologen von Interesse, zu wissen, ob der wichtigste Nahrungsstoff des Neugeborenen in den verschiedenen Thierklassen derselbe ist oder nicht.

Die Unsicherheit, in welcher wir hinsichtlich der Eigenschaften des Caseïns der Frauenmilch uns befinden, ist vor Allem dadurch bedingt, dass wir bisher keine einfache Methode zur Darstellung desselben besitzen. Aus der Kuhmilch wird das Caseïn nach Hammarsten durch Zusatz von Essigsäure abgeschieden, durch wiederholtes Lösen in verdünntem Alkali und Fällen mit Säure gereinigt und schliesslich durch Behandlung mit Alkohol und Aether vom Fett befreit. Das so gewonnene Product hat eine constante Zusammensetzung und wohl charakterisirte Eigenschaften. Es ist eine Säure von bestimmter Acidität, die mit Metallen Salze bildet. Es zeichnet sich vor allen anderen Eiweisskörpern dadurch aus, dass es vom Labferment unter bestimmten Bedingungen in das bei Gegenwart von Kalksalzen unlösliche Paracaseïn übergeführt wird.

Der Versuch, in ähnlicher Weise das Caseïn aus der Frauenmilch zu gewinnen, ist bisher nicht geglückt. Setzt man zu der

Frauenmilch eine Säure, so erhält man nach den bisherigen Angaben keinen Niederschlag. Eine Abscheidung von Caseïn tritt erst ein, wenn man nach Zusatz einer bestimmten Menge von Säure erwärmt. Emil Pfeiffer[1]), der diese Methode zuerst angab, erwärmte auf 50—55 ° R. Nach Schmidt genügt Erwärmen auf 40 °, wenn man zur völligen Abscheidung des Caseïns eine halbe Stunde lang in die Lösung Kohlensäure einleitet.

Ist schon das Erwärmen an sich nicht unbedenklich, so wird es noch bedenklicher, sobald die Lösung auch nur geringe Mengen überschüssiger Säure enthält.

Die Säure, deren sich Pfeiffer zum Neutralisiren der Milch bediente, war Salzsäure. Er ermittelte die erforderliche Menge jedes Mal empirisch.

Eine genauere Angabe über die angewandte Menge von Säure findet sich bei Dogiel[2]), der ebenfalls das Caseïn aus der Frauenmilch durch Erwärmen gewann. Er bedurfte für 100 ccm Milch etwa 20 ccm $^1/_{10}$ Normal-Salzsäure (= 0,075 g HCl). Diese Menge ist, wie aus den später mitzutheilenden Zahlen hervorgeht, grösser, als sie die alkalische Reaction der Frauenmilch erfordern würde. Wird aber das Caseïn bei Gegenwart eines Ueberschusses von Säure erwärmt, so liegt die Gefahr einer Veränderung desselben, wie bereits Schlossmann[3]) hervorhebt, sehr nahe.

Diesen Methoden gegenüber stellt das Verfahren, welches Wroblewski[4]) im Laboratorium Drechsel's ausarbeitete, einen wesentlichen Fortschritt dar. Er fällt das Caseïn ähnlich wie vor ihm Hoppe-Seyler und seine Schüler durch ein Neutralsalz. Er benutzte aber nicht wie diese schwefelsaure Magnesia, sondern schwefelsaures Ammoniak. Wroblewski war sich auch bewusst, dass hierdurch nicht, wie von Hoppe-Seyler angenommen worden war, reines Caseïn gefällt wird, sondern an Basen gebundenes Caseïn. Er löste den erhaltenen Niederschlag in Wasser, entfernte das Fett theils durch Centrifugiren, theils durch Schütteln mit Aether, dialysirte zur Entfernung des schwefelsauren Ammoniaks und fällte durch vorsichtigen Zusatz von Essigsäure. Dieses Verfahren ist im Princip

1) Die Analyse der Milch S. 34. Wiesbaden 1887.
2) Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 9 S. 603. 1885.
3) Ebenda Bd. 22 S. 207. 1896.
4) Beiträge zur Kenntniss des Frauencaseïns. Inaug.-Diss. Bern 1894.

einfach, bietet aber, wie aus der Schilderung von Wroblewski zu ersehen ist, in der Ausführung grosse Schwierigkeiten. Die Filtration und das Waschen des ersten Niederschlages sowie die Entfettung mit Aether nehmen lange Zeit in Anspruch und die Dialyse dauert nicht weniger als acht bis vierzehn Tage, so dass es „sehr schwer ist, Infection der Lösungen zu verhüten, um so schwerer, als diese einen vortrefflichen Nährboden für Mikroben abzugeben scheinen".

Zu einem weit einfacheren Verfahren führten dagegen die folgenden von mir auf Anregung von Herrn Prof. Röhmann angestellten Versuche.

I. Eine neue Methode zur Darstellung von Frauencaseïn.

Benutzt wurde zur Darstellung des Frauencaseïns die Milch mehrerer milchreicher, an der Königl. Universitäts-Kinderklinik angestellter Ammen, die sich ein bis drei Monate post partum befanden; und zwar wurde die Milch meist als Mischmilch frisch verarbeitet. Dieselbe wurde durch Centrifugiren vom grössten Theil des Fettes befreit. Die unter der festen, weissen bis citronengelben Fettschicht befindliche Magermilch verliert bei gut gelungener Entfettung den undurchsichtigen weissen oder mehr gelblichen Farbcharakter und wird bläulich, opalescent, durchscheinend, im Gegensatz zur Kuhmilch, welche stets weiss und undurchsichtig bleibt. Sie wird nach vorsichtigem Durchstossen der Fettschicht mittelst Heber gewonnen. Aus dieser Magermilch wurde das Caseïn in verschiedener Weise durch Zusatz von Säure zu fällen gesucht.

Hierbei wurde, um eine Zersetzung des Frauencaseïns zu vermeiden, sehr vorsichtig zu Werke gegangen. Einmal wählte ich eine verdünnte Säure in Gestalt der $^1/_{10}$ Normalsäurelösung, und zweitens beabsichtigte ich, nur soviel Säure zuzusetzen, als erforderlich war, um die Basen, welche in der Milch an Caseïn und andere schwache Säuren gebunden sind, durch eine stärkere Säure zu binden.

Die erforderliche Säuremenge ermittelte ich in der Weise, dass ich 10 ccm Milch mit $^1/_{10}$ Normalschwefelsäure titrirte, indem ich als Indicator Lakmoidpapier benutzte, und zwar bestimmte ich sowohl den Punkt, an dem sich blaues Papier soeben zu röthen begann, wie denjenigen, an welchem die Blaufärbung des rothen Papiers verschwand.

In dieser Weise hat bereits Courant die Reaction der Kuh-

milch untersucht, für die Frauenmilch gibt er aber nur die Werthe an, welche er bei Anwendung von blauem Lakmoidpapier erhielt.

Die folgenden Zahlen füllen die von ihm gelassene Lücke aus.

Zeit nach der Entbindung	10 ccm Milch erfordern		
	bis zur beginnenden Röthung von blauem Lakmoidpapier	bis zum Verschwinden der Rothfärbung auf rothem Lakmoidpapier	
	ccm $^1/_{10}$ Normal-Schwefelsäure		
14 Tage	1,85	2,30	colostrumhaltig
15 Tage	1,95	2,45	colostrumhaltig
20 Tage	1,50	1,85	colostrumhaltig
15 Tage	1,05	1,35	
1 Monat	1,05	1,35	
5 Wochen	1,1	1,50	
6 Wochen	0,95	1,30	
7 Wochen	0,95	1,35	
2 Monate	1,15	1,40	
	1,30	1,50	
3 Monate	1,35	1,60	
$5^1/_2$ Monate	1,4	1,60	
12 Monate	1,4	1,70	
	1,3	1,70	

Die Zahlen, welche angeben, wieviel Cubikcentimeter $^1/_{10}$ Normalschwefelsäure erforderlich waren, eine eben beginnende Röthung von blauem Lakmoidpapier zu erzeugen, entsprechen den von Courant[1]) gefundenen.

Die bei Anwendung von rothem Lakmoidpapier erhaltenen Zahlen sind, wie auch bei der Kuhmilch, stets erheblich höher, als die bei blauem. Sieht man von dem ersten Fall, bei welchem die Milch offenbar nicht vollkommen normal war, ab, so beträgt die Alkalescenz für blaues Lakmoidpapier 0,95 bis 1,4 ccm, im Durchschnitt 1,2 ccm, die für rothes Lakmoidpapier 1,30 bis 1,70 ccm, im Durchschnitt 1,49 ccm $^1/_{10}$ Normalschwefelsäure für 10 ccm Frauenmilch.

Da das Caseïn der Kuhmilch aus den Lösungen seiner Salze bei Zusatz einer starken Säure in dem Augenblick vollkommen ausgefallen ist, wo die Lösung rothes Lakmoidpapier nicht mehr bläut, so konnte man annehmen, dass auch das Caseïn der Frauenmilch aus seinen Verbindungen mit Basen in Freiheit gesetzt wurde, sobald man so viel Säure hinzugesetzt hatte, als der Alkalescenz für rothes Lakmoid entsprach.

1) Ueber die Reaction der Kuh- und Frauenmilch. Dieses Arch. Bd. 50 S. 109. 1891.

Wollte man statt Salzsäure oder Schwefelsäure eine andere Säure, z. B. Essigsäure, benutzen, so hatte man die Acidität derselben zu berücksichtigen. Nach den Beobachtungen von W. Spitzer[1]) entsprechen 10 ccm $^1/_{10}$ Normalschwefelsäure 11,8 ccm $^1/_{10}$ Normalessigsäure.

Versetzte ich nun ein Quantum Magermilch mit der in der dargelegten Weise ermittelten Menge $^1/_{10}$ Normalschwefelsäure oder Salzsäure oder mit der entsprechenden Menge $^1/_{10}$ Normalessigsäure, so liess sich keine Fällung in der Flüssigkeit constatiren, was mit allen früheren Beobachtungen über diesen Gegenstand übereinstimmt. Geht man in dem Zusatz der Essigsäure vorsichtig weiter, so wird man bei mässigem Ueberschuss meist auch keinen Niederschlag von Caseïn zu verzeichnen haben, selbst wenn man die Milch mehrere Tage stehen lässt.

Diese unerwartete Thatsache schien uns nur so erklärlich, dass in der Frauenmilch irgend welche Stoffe vorhanden waren, welche das Ausfallen des Caseïns verhinderten. Es wurde versucht, dieselben durch Dialyse zu entfernen. Die neutralisirte Flüssigkeit wurde zuerst gegen thymolisirtes destillirtes Wasser dialysirt. Zweckmässiger erwies sich aber Chloroformwasser.

Bei diesem Vorgehen trat die gewünschte Abscheidung des Caseïns ein, sowohl, wenn man mit Schwefelsäure als auch mit Salzsäure oder Essigsäure neutralisirt hatte. Essigsäure wurde aber bevorzugt, da das Caseïn in einem Ueberschuss derselben unlöslich und bei ihrer Anwendung die Gefahr einer Veränderung des Caseïns geringer ist.

Im Allgemeinen wurde die Frauenmilch mit etwa einem Fünftel ihres Volumens $^1/_{10}$ Normalessigsäure in Pergamentschläuche gefüllt und diese in Behälter mit Chloroformwasser hineingehängt. Das Wasser wurde besonders am ersten Tage mehrmals gewechselt. Nach zwei bis drei Tagen findet man bereits den Niederschlag am Grunde der Schläuche, nach fünf bis sechs Tagen ist der Höhepunkt der Fällung erreicht. Vollkommen nannte ich sie dann, wenn die überstehende Flüssigkeit nicht mehr trübe opalescent, sondern wasserklar war.

---

1) Dieses Archiv Bd. 50 S. 564.

Das wasserklare Filtrat gibt folgende Reactionen:

1. Beim Kochen geringe Trübung oder stärkere Opalescenz, die sich in Salpetersäure, ebenso in Essigsäure leicht löst, bei Zusatz von mehr Salpetersäure wieder erscheint.
2. Bei Zusatz von conc. Salpetersäure in der Kälte schwache Opalescenz.
3. Mit Millon's Reagens geringer flockiger Niederschlag, beim Kochen allmälig Rothfärbung.
4. Essigsäure und Kochsalz stärkere Opalescenz, beim Erwärmen flockiger Niederschlag.
5. Essigsäure und Ferrocyankalium feinflockiger Niederschlag.
6. Salzsäure und Phosphorwolframsäure deutlicherer Niederschlag.
7. Mit gepulvertem $MgSO_4$ bei 36° kein Niederschlag, doch lässt sich die vorher opalescente Flüssigkeit klar filtriren. Dieses Filtrat wird beim Erhitzen opalescent, bei Zusatz von Salpetersäure scheidet sich ein flockiger Niederschlag in geringer Menge ab. Mit Gerbsäure feinflockige Fällung.

Auch das umgekehrte Verfahren, zunächst Dialyse, dann Zusatz von Essigsäure und Stehenlassen während einiger Stunden führt meist zum Ziel.

Nachdem auf diese Weise die Möglichkeit einer methodischen Verwerthung der Ausfällbarkeit der Frauenmilch durch Essigsäure gewährleistet war, versuchte ich, ob das Dialysiren in allen Fällen zur Ausfällung erforderlich sei oder ob die Ausfällung auch ohne Dialyse von statten ginge.

In einem kleinen Theil der Fälle gelang dies auch vollkommen, wenn man die Milch 24 Stunden mit dem zugesetzten Essigsäurequantum im Kalten stehen liess. Man fand dann den nächsten Morgen am Boden des Becherglases die Caseïnflocken und darüber eine klare wasserhelle Flüssigkeit, deren Reactionen im Wesentlichen dieselben waren, wie die, welche wir in dem Filtrate des durch Dialyse zur Abscheidung gekommenen Niederschlags erhielten.

Neben den durch Dialyse entfernbaren krystalloiden Bestandtheilen der Frauenmilch schien mir auch das Fett der Ausfällung ein Hinderniss zu bieten; die sehr feinen Caseïnflöckchen, die sich bei Säurezusatz ausscheiden, haften an den gleichmässig in der Milch vertheilten mikroskopischen Fetttröpfchen.

Damit im Einklang stand die bereits erwähnte Thatsache, dass Dialyse gegen Chloroformwasser für die Abscheidung des Caseïns günstiger war als Dialyse gegen thymolisirtes Wasser. Im ersteren Falle diffundirte Chloroform zur Milch und löste den Rest von Fett, der in derselben geblieben war, auf. Ich versuchte desshalb auch,

anstatt durch Dialyse durch Entfernung des Fettes mit Aether günstigere Bedingungen für die Fällung des Caseïns in der Frauenmilch zu schaffen.

Nachdem ein Theil des Fettes, welches sich beim Stehen der Milch auf der Oberfläche angesammelt hatte, mechanisch entfernt worden war, wurde die Milch in einem Scheidetrichter mit Aether, und zwar einem Drittel des Volumens der angewandten Milchmenge, vorsichtig, um Emulsion zu vermeiden, durchgemischt; dann wurde nach einigen Stunden die Milch abgelassen, um sie wieder mit frischem Aether zu versetzen. Dies wiederholte ich fünf Mal. Hierauf wurde die Milch mit einem Fünftel ihres Volumens $^1/_{10}$ Normalessigsäure versetzt; sie blieb bis zum nächsten Tage im Kalten stehen. Am anderen Morgen zeigte sich dann Folgendes: In der Milch hatten sich zwei Schichten gebildet, eine dicke, gelbliche, gallertige obere und eine durchscheinende untere Schicht. Filtrirte ich, so blieb die erstgenannte auf dem Filter.

Die zurückgehaltenen scholligen Massen bearbeitete ich gründlich unter Zerdrücken und Zerreiben erst mit wenig, dann mit mehr Alkohol, schliesslich zur völligen Entfernung des Fettes mit Aether. Ich erhielt so ein Rohcaseïn, das in seinen wesentlichen Eigenschaften mit dem unter Anwendung der Dialyse gewonnenen übereinstimmte. Die Ausbeute lag innerhalb der auch sonst gewonnenen Mengen.

Das Schütteln mit Aether ist aber besonders wegen der leicht eintretenden Emulsionsbildung weniger zweckmässig als die Dialyse.

Nach diesen Erfahrungen verwandte ich zur Darstellung des Frauencaseïns folgende Methode:

Die durch Centrifugiren von Fett möglichst befreite Milch wird mit einem Fünftel ihres Volumens $^1/_{10}$ Normalessigsäure versetzt und in Pergamentschläuchen fünf Tage gegen täglich gewechseltes Chloroformwasser dialysirt. Der Inhalt der Schläuche wird in ein Becherglas oder Centrifugenglas gegossen. Wenn der Niederschlag sich abgesetzt hat, wird die überstehende Flüssigkeit abgehebert. Der Niederschlag wird entweder auf einem Filter oder unter Centrifugiren erst mit Wasser, dem einige Tropfen sehr verdünnter Essigsäure zugesetzt worden sind, dann mit Alkohol und Aether gewaschen und schliesslich im Soxhlet'schen Extractionsapparat völlig entfettet.

Man erhält so nach Abdunsten des Aethers das Caseïn auch aus der Frauenmilch als ein weisses, feines, nicht hygroskopisches Pulver.

Die Ausbeuten an Caseïn wechselten aus bisher nicht näher studirten Ursachen. Bald verarbeitete ich Milch, von der mir 100 ccm eine Ausbeute von 0,9 g „Rohcaseïn" ergaben, bald musste ich mich mit 0,2–0,3 g begnügen.

II. Eigenschaften des dargestellten Frauencaseïns.

1. Löslichkeit.

Das in der geschilderten Weise durch Säurefällung gewonnene Frauencaseïn ist wie das Kuhcaseïn in Wasser unlöslich. Die Lösung gelingt jedoch leicht, ebenso wie auch bei Kuhcaseïn, durch Alkalien, Erdalkalien, die Carbonate der Alkalien und Erdalkalien, sowie durch andere für Lakmoid alkalisch reagirende Salze, wie secundäres phosphorsaures Natrium, essigsaures Natrium u. A. Alle diese Lösungen zeigen im Gegensatz zu den gleichen Lösungen des Kuhcaseïns den übereinstimmenden Unterschied, dass erstere gelblich trübe opalescent, letztere mehr bläulich durchscheinend aussehen.

2. Verhalten des Caseïns zu Lösungen von Neutralsalzen.

Behandelt man das durch Dialyse und Säurefällung gewonnene Rohcaseïn mit einer 10%igen Lösung von Natriumchlorid, Magnesium- oder Natriumsulfat, so geht ein kleiner Theil des Präparates in Lösung. Man erhält beim Filtriren eine klare Flüssigkeit, in welcher Salzsäure und Phosphorwolframsäure eine flockige Fällung erzeugt. Die Flüssigkeit bleibt aber beim Erhitzen, auch nach dem Ansäuern mit Essigsäure, unverändert; nach dem Kochen entsteht bei Zusatz von Salpetersäure eine leichte Opalescenz. Bei wiederholter Extraction gibt das Filtrat sehr bald keinen Niederschlag mehr mit Phosphorwolframsäure. Dem Caseïn ist also und zwar in geringer Menge ein anderer in Salzen löslicher Stoff beigemengt; das Caseïn selbst ist in Neutralsalzen unlöslich.

3. Verhalten der Lösungen des Frauencaseïns zu Säuren.

Aus den Lösungen lässt sich das Frauencaseïn ebenso wie das Kuhcaseïn durch Mineral- und organische Säuren ausfällen. Ein

Unterschied zeigt sich nur in der äusseren Beschaffenheit der entstehenden Niederschläge. Das Kuhcaseïn fällt in weissen, derben Flocken, das Frauencaseïn in mehr gallertigen, grösseren Flocken; erstere sind leicht, letztere häufig schwieriger abzufiltriren. Das Frauencaseïn ist ebenso wie das Kuhcaseïn in überschüssiger Salzsäure sowie in Phosphorsäure leicht löslich. Das genauere Verhalten sei durch folgende Versuche erläutert:

1,5 g Caseïn Höchst werden zuerst mit 25 ccm Wasser angerührt und allmälig mit 8 ccm $^1/_{10}$ Normal-Natronlauge versetzt. Dazu wird Wasser hinzugefügt bis zu einer Gesammtflüssigkeitsmenge von 50 ccm. In gleicher Weise wird mit Frauencaseïn verfahren.

Die Lösungen reagiren für Curcuma sehr schwach alkalisch. Ein geringer Theil bleibt ungelöst. Die Lösung des Kuhcaseïn filtrirt schnell, fast klar, die des Frauencaseïns langsam und stark gelblich opalescent.

Bei Zusatz von

1. $^1/_{20}$ Normal-Essigsäure fällt das Kuhcaseïn in derben weissen Flocken, Frauencaseïn in grösseren, gallertigen. Bei einem Ueberschuss von Säure befinden sich beim Kuhcaseïn in einer klaren Flüssigkeit kleine weisse Flocken, beim Frauencaseïn sind die Flocken ebenfalls fein und setzen sich beim Stehen ab, die Zwischenflüssigkeit ist aber milchig opalescent. In beiden Fällen filtrirt die Flüssigkeit wasserklar und durch Salzsäure und Phosphorwolframsäure erhält man in beiden einen geringen Niederschlag.

2. $^1/_{20}$ Normal-Schwefelsäure tropfenweise zugesetzt (2 ccm obiger Caseïnlösung wurden mit 1,5 ccm dieser Schwefelsäure versetzt) geben bei Kuhcaseïn wieder einen Ausfall in derben Flocken, die aber nicht ganz so derb sind, wie bei Essigsäurezusatz. Die Flüssigkeit, in der die Caseïnflocken sich befinden, ist trübe, sie filtrirt langsam, das Frauencaseïn fällt feinflockig, gallertig, die Flüssigkeit filtrirt sehr langsam. Das Filtrat gibt bei Zufügung von Salzsäure und Phosphorwolframsäure einen stärkeren Niederschlag als im Parallelversuch mit Kuhcaseïn.

3. $^1/_{20}$ Normal-Salzsäure. 2 ccm Caseïnlösung werden mit 1,2—1,4 ccm der Salzsäure versetzt. Kuh- und Frauencaseïn geben anfangs Fällung, die bei beiden im Ueberschuss leicht löslich ist. Beim Kuhcaseïn ist die Flüssigkeit wasserklar, beim Frauencaseïn schwach getrübt. Bei Zusatz von Chlornatrium in Substanz, fällt aus der salzsauren Lösung Kuhcaseïn in weissen derben Flocken, Frauencaseïn in gallertigen. Bei der Kuhcaseïnlösung geht das Filtrat dieser Fällung leicht und wasserklar durch das Filter, bei Frauencaseïn langsam.

4. Phosphorsäure (20 ccm officin. auf 1000 ccm Wasser). In beiden Fällen erhält man einen im Ueberschuss völlig löslichen Niederschlag.

4. Verhalten der Lösungen des Frauencaseïns zu Neutralsalzen.

Kochsalz gibt weder in Kuh- noch in Frauencaseïnlösung eine Fällung. Mit Magnesiumsulfat entstehen in beiden gallertige Nieder-

schläge, deren Abscheidung durch Erwärmen auf 40° begünstigt wird. Schwefelsaures Ammoniak fällt ebenfalls beide Caseïnarten aus.

Auch hier hatten die in Lösungen von Frauencaseïn erzeugten Fällungen einen stärker gallertigen Charakter als die in Kuhcaseïnlösung entstandenen.

5. Verhalten der Lösungen des Frauencaseïns zu einigen Metallsalzen.

Kupfersulfat gibt mit Kuhcaseïnlösung eine blassblaue, derbe Fällung, in der Frauencaseïnlösung einen mehr gallertigen grünlichen Niederschlag. Die über dem Niederschlag befindliche Flüssigkeit ist beim Kuhcaseïn vollkommen klar, beim Frauencaseïn wenig getrübt.

Aehnlich mit Silbernitrat: in ersterer Lösung derbe weisse, in letzterer gallertige Flocken. Die überstehende Flüssigkeit hier opalescent, dort wasserklar.

Dasselbe Verhalten auch beim Fällen mit Sublimat; in beiden Lösungen grobflockig gallertige Niederschläge, die über dem Niederschlag befindliche Flüssigkeit ist beim Kuhcaseïn schwach, beim Frauencaseïn stark opalescent.

6. Verhalten des Frauencaseïns bei der Verdauung mit Pepsinsalzsäure.

Bei der Verdauung des Caseïns aus Kuhmilch scheidet sich bekanntlich je nach den Bedingungen, unter denen der Versuch angestellt wird, aus der Lösung eine mehr oder weniger grosse Menge des gallertigen Paranucleïns aus.

In Bezug auf das Frauencaseïn haben die bisher nach dieser Richtung hin angestellten Versuche zu völlig widersprechenden Ergebnissen geführt. Während A. Dogiel bei der Verdauung des von ihm dargestellten Frauencaseïns die Entstehung eines gelatinösen, in Natronlauge leicht löslichen Niederschlages beobachtete, schliesst Wroblewski in Uebereinstimmung mit F. v. Szontagh[1]), dass sich aus dem Frauencaseïn kein Paranucleïn bildet. Die Thatsache, dass aus Frauencaseïn kein Nucleïn bei der Verdauung hervorgehe, bilde einen hervorragenden, wesentlichen chemischen Unterschied desselben vom Kuhcaseïn.

1) Jahresber. f. Thierchemie 1892 S. 172.

Eigene Versuche verliefen in folgender Weise:

Es wurden sowohl vom Kuhcaseïn wie vom Frauencaseïn 1,5 g in etwa 8 ccm $^1/_{10}$ Normalnatronlauge und 50 ccm dest. Wasser gelöst. Von dieser Lösung wurden je 8 ccm mit 8 ccm 0,25 % iger Salzsäure und 1 ccm eines stark wirksamen Glycerinextractes aus der Schleimhaut des Hundemagens versetzt. Das Caseïn, das bei Zusatz der Salzsäure zunächst ausfiel, löste sich im Ueberschuss der Salzsäure leicht wieder auf. Nach 1 Stunde und 50 Minuten hatte sich in der Kuhcaseïnlösung ein gallertiger, flockiger Niederschlag abgeschieden, der durch die ganze Flüssigkeit gleichmässig vertheilt war.

Die Lösung des Frauencaseïns zeigte keinen Niederschlag, sondern nur eine etwas stärkere Trübung. Nach 2 Stunden und 40 Minuten hatte sich der Niederschlag aus der Kuhcaseïnlösung zu Boden gesenkt. In der Lösung des Frauencaseïns war noch keine Abscheidung eines solchen erfolgt. Dagegen war nach drei Stunden auch in dieser ein flockiger Niederschlag aufgetreten. Die Menge desselben war aber bei weitem geringer als im Versuche mit Kuhcaseïn.

Dasselbe Resultat gab ein Versuch, bei welchem 4 ccm der Caseïnlösung mit 2 ccm 0,25 % iger Salzsäure und fünf Tropfen des Glycerinextractes versetzt wurden.

Hiernach erweist sich also die Angabe von Dogiel richtig, insofern sich auch aus dem Frauencaseïn bei Einwirkung von Pepsinsalzsäure ein Paranucleïn abscheidet. Es unterscheidet sich aber das Frauencaseïn, wie es zu den erwähnten Versuchen diente, vom Kuhcaseïn dadurch, dass die Menge des entstehenden Paranucleïnniederschlages eine geringere ist. Die negativen Ergebnisse von Wroblewski und Szontagh beruhen vermuthlich darauf, dass diese Forscher entweder zu verdünnte Caseïnlösungen der Verdauung unterwarfen oder die Beobachtung derselben nicht lange genug fortsetzten.

7. Verhalten des Frauencaseïns zum Labferment.

Hammarsten hat uns bekanntlich gelehrt, wie man aus Kuhcaseïn Lösungen herstellen kann, die durch Lab gerinnen. Die Bedingungen, unter denen die Gerinnung eintritt, die Abhängigkeit derselben vom Gehalt der Lösung an Caseïn, von ihrer Reaction, von der Menge und den Eigenschaften der erforderlichen Kalksalze wurden von Courant genauer festgestellt.

Nach Courant verfährt man z. B. mit dem Kuhcaseïn in folgender Weise. Man löst 0,3 g Kuhcaseïn in 10 ccm Kalkwasser und setzt hierzu diejenige Menge Phosphorsäure, welche nach einem Vorversuche erforderlich ist, um bei Abwesenheit von Caseïn das Kalkwasser für Phenolphtalein zu neutralisiren. Die Caseïnlösung

ist milchweiss und gibt bei Zusatz von Labferment ein derbes, zusammenhängendes Gerinnsel, das sich nach einiger Zeit von den Wandungen des Gefässes zurückzieht und von einer wasserklaren Flüssigkeit umgeben ist.

Nimmt man nun diesen Versuch mit Frauencaseïn vor, so zeigen sich eine Reihe von Unterschieden.

Erstens ist die Lösung des Frauencaseïns in Kalkwasser stärker opalescent; ferner finden wir, dass ein Zusatz von Phosphorsäure keine milchweisse Flüssigkeit ergibt, sondern die Lösung mehr trübe, gelblich durchscheinend werden lässt, und dass endlich die Gerinnung selbst nicht in festem Kuchen, sondern in lockeren Flocken, die auch erst nach längerer Zeit auftreten, stattfindet.

8. Die Acidität des Frauencaseïns.

Die bisher mitgetheilten Beobachtungen zeigen auf der einen Seite eine weitgehende Uebereinstimmung in dem Verhalten des Kuh- und Frauencaseïns, auf der anderen jedoch auch wieder sehr erhebliche Unterschiede. Die letzteren würden sich am einfachsten erklären lassen durch die Annahme, dass das von uns untersuchte Präparat nicht ein einheitlicher Körper, sondern ein Gemenge war von einem dem Kuhcaseïn sehr ähnlichen, vielleicht sogar mit ihm identischen Körper und einem oder mehreren Eiweissstoffen. Die stärkere Opalescenz der Lösungen, die flockige, gallertige Beschaffenheit der Fällungen, die Bildung einer geringen Menge von Paranucleïn bei der Pepsinverdauung, die Eigenschaften des bei der Labgerinnung entstehenden Gerinnsels würden, wie nicht näher ausgeführt werden soll, mit dieser Annahme sehr wohl vereinbar sein. War aber dem Caseïn ein anderer Eiweisskörper beigemengt, so musste sich dies auch an der Acidität des untersuchten Präparates aus Frauenmilch zeigen.

Bekanntlich hat das Caseïn den Charakter einer Säure, wenigstens lassen sich die löslichen Verbindungen mit Alkalien und Erdalkalien, sowie die in Wasser unlöslichen mit den Schwermetallen als Salze auffassen. Die Acidität des Kuhcaseïns, d. h. die Menge Alkali, welche erforderlich ist, um eine für Phenolphtalein neutrale Alkaliverbindung des Caseïns zu bilden, ermittelte Courant in der Weise, dass er das Caseïn in einem geringen Ueberschuss von Alkali löste und dann $^1/_{10}$ Normalschwefelsäure aus einer Bürette so lange zufügte, bis die durch Phenolphtalein roth gefärbte Flüssigkeit farblos wurde.

Die Differenz zwischen der Anzahl Cubikcentimeter $^1/_{10}$ Normalnatronlauge, die zum Lösen verwendet wurden, und der Anzahl der zur Neutralisation der Lösung verbrauchten Cubikcentimeter $^1/_{10}$ Normalschwefelsäure ergab die Menge Natrium, welche das Caseïn chemisch gebunden hatte.

Verfährt man in gleicher Weise mit dem Frauencaseïn, so ergibt sich ein weiterer wesentlicher Unterschied gegenüber dem Kuhcaseïn. Während nach dem Verfahren von Courant 0,3 g lufttrockenes Kuhcaseïn durch 2,75 ccm $^1/_{10}$ Normalnatronlauge für Phenolphtalein neutralisirt werden, erfordern 0,3 g lufttrockenes Frauencaseïn nur 1,6—1,7 ccm $^1/_{10}$ Normalnatronlauge. Die Acidität des Frauencaseïns beträgt also kaum zwei Drittel von der des Kuhcaseïns.

9. Verhalten des Frauencaseïns nach dem Lösen in Alkali und Fällen mit Säuren.

Die geringere Acidität des Frauencaseïns könnte also in der That dafür sprechen, dass dasselbe aus einem Gemenge und zwar aus einem dem Kuhcaseïn ähnlichen Eiweisskörper und einem oder mehreren anderen nicht saueren Eiweisskörpern besteht. Dies ist aber bei näherer Ueberlegung sehr unwahrscheinlich.

Das Caseïn wurde aus wässeriger Lösung durch Zusatz einer Säure gefällt. In Wasser lösliche Eiweisskörper, also Stoffe, welche zur Gruppe der Albumine gehören, können ihm nicht beigemengt sein, wohl aber Globuline. Denn diese würden bei der Dialyse aus der neutralen Lösung neben dem Caseïn ausfallen, sobald die Lösung salzfrei wird. Ob dies der Fall ist, müsste sich bei der Behandlung des Rohcaseïns mit Salzlösungen zeigen, da in ihnen die Globuline löslich sind. Nun haben wir bereits erwähnt, wie sich das Rohcaseïn zu Salzlösungen verhält. Es gibt an dieselben einen Eiweisskörper ab. Die Menge desselben ist jedoch so gering, dass nach der Extraction mit Salzlösungen und Entfernung des Salzes mit Wasser sich die Acidität des Frauencaseïns kaum geändert hat.

Auch wenn man nicht das durch Alkohol und Aether getrocknete, sondern das frisch gefällte Caseïn mit Salzlösungen extrahirt, erhält man ein Caseïn von der oben erwähnten geringen Acidität.

Somit muss das Frauencaseïn entweder ein von dem Kuhcaseïn wesentlich verschiedener Körper oder die Verbindung eines dem Kuhcaseïn ähnlichen bezw. mit ihm übereinstimmenden Körpers und

irgend eines basischen Stoffes, d. h. eine sauere, salzartige Verbindung sein.

In ersterem Falle konnte man erwarten, dass bei wiederholtem Lösen in Alkali und Fällen mit Säure die Acidität die gleiche blieb, in letzterem war es möglich, dass hierbei der basische Bestandtheil in Lösung blieb, während sich das Caseïn wieder ausschied. Es musste sich dann durch wiederholtes Auflösen und Fällen die Acidität des Frauencaseïns steigern lassen.

Dieses Verfahren des wiederholten Lösens und Fällens war bekanntlich von Hammarsten zur Reinigung des Kuhcaseïns benutzt worden. Betrachten wir desshalb zunächst das Verhalten des Kuhcaseïns.

Abgerahmte und mit destillirtem Wasser verdünnte Milch wurde mit der entsprechenden Menge Essigsäure versetzt, das ausgefallene Caseïn auf Leinwand gesammelt, mit Wasser gewaschen und mit Alkohol und Aether völlig entfettet und entwässert. 0,3 g des lufttrockenen Präparates banden 2,4 ccm Normalnatronlauge. Von diesem Caseïn wurden 4,79 g in 40 ccm Normalammoniak und 100 ccm Wasser gelöst, dann wurden, was sich als zweckmässig erwiesen hatte, 10 ccm gesättigter Kochsalzlösung hinzugefügt und das Caseïn nunmehr durch $^1/_{10}$ Normalessigsäure wieder ausgefällt. Die Acidität betrug jetzt 2,8. Durch nochmaliges Lösen und Fällen stieg dieselbe auf 2,9 und blieb bei weiterem Lösen und Fällen unverändert. In dem Filtrat, welches nach dem ersten Auflösen und Fällen erhalten wurde, liess sich ein Eiweisskörper nachweisen, der beim Kochen gerann und sich durch Kochsalz aussalzen liess.

Bei den Versuchen mit Frauencaseïn löste ich das Rohcaseïn anfangs in einem Ueberschuss von verdünnter Natronlauge, z. B. 0,4 g in 10 ccm einer $^1/_{10}$ Normallösung. Beim Zusatz verdünnter Essigsäure fiel das Caseïn jedoch nur sehr unvollkommen wieder aus. Dasselbe war der Fall, als ich das Caseïn in essigsaurem Natrium löste, z. B. 0,25 g in 10 ccm einer 10 %igen Lösung.

Besser gelang die Fällung, als nur ein Drittel derjenigen Menge $^1/_{10}$ Normalnatronlauge zur Lösung verwendet wurde, welche erforderlich gewesen wäre, um Neutralität für Phenolphtaleïn zu erzeugen. Die Lösung des Frauencaseïns erfolgt in so geringen Mengen Alkali recht gut, wenn man nur beim Einbringen desselben für gutes Zerdrücken der sich bildenden Klümpchen sorgt. Die erste Fällung

bei Zusatz von Säure machte mitunter Schwierigkeiten, trat jedoch bei Zusatz einiger Tropfen concentrirter Kochsalzlösung stets ein. Löst man zum zweiten und dritten Mal wieder auf, so sind die Fällungen nie schwer zu erhalten.

Auffallend war hierbei, dass mit dem wiederholten Auflösen und Fällen der Caseïn-Niederschlag nicht mehr in feinen, gallertigen, sondern in derben, dem Kuhcaseïn ähnlichen Flocken ausfiel.

Hand in Hand damit ging eine Steigerung der Acidität von 1,6 ccm $^1/_{10}$ Normal-Natronlauge für 0,3 g Caseïn auf 2,3 ccm.

Trotz des vorsichtigen Zusatzes von $^1/_{10}$ Normalnatronlauge waren aber die Mengen des wiedergewonnenen Caseïns sehr gering, der bei Weitem grösste Theil des Präparates blieb in Lösung.

Geringer wurden die Verluste, als ich statt $^1/_{10}$ Normalnatronlauge $^1/_{10}$ Normal-Ammoniaklösung verwendete. Von derselben wurde zum Caseïn so viel hinzugefügt, als der Rechnung nach nöthig war, um grade Neutralität für Phenolphtaleïn zu erzielen. Der Lösung fügte ich etwas concentrirte Kochsalzlösung hinzu und $^1/_{10}$ Normalessigsäure, bis vollständige Abscheidung des Caseïns erfolgte. Auch hierbei änderte sich in der erwähnten Weise die physikalische Beschaffenheit der Füllung, sowie die Acidität. Nach sechsmaligem Auflösen und Fällen erhielt ich ein Präparat, das eine Acidität von 2,5 hatte, sich also nur noch wenig von dem Kuhcaseïn unterschied.

Ich ging nun daran, zu sehen, wie sich die Präparate mit gesteigerter Acidität bei Gerinnung mit Lab verhalten würden.

Ueber die Art der Versuchsanordnung bei meinen vergleichenden Gerinnungsversuchen habe ich bereits oben gesprochen. Es handelte sich hier darum, zu sehen, ob die geschilderten Differenzen, welche der Gerinnungsprocess mit Lab bei Kuh- und Frauencaseïn aufwies, sich nach erfolgter Reinigung des Präparats ausgleichen würden oder nicht. In der That verschwinden die aufgestellten Unterschiede um so mehr, je mehr sich das Caseïn in seiner Acidität dem Kuhcaseïn nähert. Löst man das auf die Acidität von 2,5 gebrachte Frauencaseïn in Kalkwasser, so wird die Lösung durchsichtig und nur wenig opalescent; ein vorsichtiger Zusatz von Phosphorsäure in berechneter Menge macht die Flüssigkeit milchweiss, und

beim Zufügen des Labextracts entsteht keine Gerinnung in Flocken, sondern ein derber Gerinnungskuchen, der sich von dem des Kuhcaseïns nur noch wenig unterscheidet.

Diese Beobachtungen lassen sich kaum anders erklären als durch die Annahme, dass der von uns bisher als Frauencaseïn bezeichnete Körper eine Verbindung ist von einem dem Kuhcaseïn ähnlichen Nucleoalbumin mit einem basischen Eiweisskörper, vielleicht einem Histon oder Protamin.

Diese Verbindung ist als ein saures Salz zu betrachten, welches in der Frauenmilch durch eine anorganische Base in Lösung gehalten wird.

Um diese Hypothese auf ihre Richtigkeit zu prüfen, wäre es zunächst erforderlich, den sauren Bestandtheil in Bezug auf seine elementare Zusammensetzung mit dem Kuhcaseïn zu vergleichen. Hierzu gehören Mengen von Substanz, die mir nicht mehr zur Verfügung standen. Die weitere Untersuchung muss ich daher Anderen überlassen.

Fasse ich die Ergebnisse der Arbeit kurz zusammen, so ist Folgendes zu sagen:

1. Es gelingt, aus der Frauenmilch auch ohne Erwärmen einen sauren, phosphorhaltigen Eiweisskörper zu fällen, wenn man die Milch nach Zusatz einer bestimmten Säuremenge gegen Chloroformwasser dialysirt oder wenn man das Fett durch Centrifugiren und Aetherextraction wegschafft.

2. Dieser Eiweisskörper hat Eigenschaften, durch die er dem Kuhcaseïn zwar ähnelt, sich aber doch auch wesentlich von ihm unterscheidet.

3. Durch wiederholtes Lösen in Alkali und Fällen mit Säure erhält man aus ihm einen Körper, der in seinen Reactionen eine sehr weitgehende Uebereinstimmung mit dem Caseïn der Kuhmilch zeigt. Er lässt sich aus seinen Lösungen durch Säuren in derben Flocken fällen, hat anscheinend dieselbe Acidität wie Kuhcaseïn und gerinnt unter denselben Bedingungen wie dieses zu einem festen Kuchen.

Zum Schlusse ist es mir ein Bedürfniss, Herrn Professor Dr. Röhmann für die Anregung zu dieser Arbeit und für das

allzeit rege Interesse, das er während der Ausführung der Versuche bewies, meinen verbindlichsten Dank auszusprechen.

Dessgleichen bin ich zu grossem Danke dem Director der königlichen Kinderklinik zu Breslau, Herrn Professor Dr. Czerny und seinem Assistenten Herrn Dr. Thiemich verpflichtet, durch deren überaus gütiges Entgegenkommen es mir ermöglicht war, die zur Bearbeitung des Themas erforderlichen Mengen Frauenmilch zu erhalten.

Lebenslauf.

Verfasser, Erwin Kobrak, ist am 3. December 1874 als Sohn des Kaufmanns Adolf Kobrak und seiner Gattin Valesca Kobrak geb. Zepler in Breslau geboren. Seine Schulbildung genoss er theils in Breslau auf dem Gymnasium zu St. Maria Magdalena, theils in Berlin auf dem Königlichen Wilhelmsgymnasium. Das Zeugnis der Reife erhielt er an ersterer Anstalt Ostern 1893. — Nach drei Semester langem Studium des Maschinenbaufaches an der technischen Hochschule zu Charlottenburg widmete er sich dem Studium der Medicin, dem er zunächst in Breslau oblag, woselbst er das Tentamen physicum im Sommer 1895 bestand, dann in München und schliesslich wieder in Breslau. Hier beendete er am 1. Juli 1899 das ärztliche Staatsexamen und unterzog sich Ende des Monats dem Examen rigorosum. Seiner militärischen Dienstpflicht bei der Waffe genügte er im Sommer 1897.

Während des Studiums besuchte er die Vorlesungen und praktischen Curse folgender Herren Professoren und Docenten:

Angerer, Barlow, Bonhoefer, Bollinger, Born, Chun, Ferd. Cohn†, Hermann Cohn, Czerny, Filehne, Flügge, Groenouw, Hasse, Heidenhain†, Henke, Hürthle, Kast, Keilmann, Küstner, Ladenburg, Mann, O. E. Meyer, v. Mikulicz, Moritz, Neisser, Ponfick, Posselt, Röhmann, Sachs, Schech, Sittmann, Stern, Uhthoff, Wernicke, v. Winckel, Ziegenspeck, Ziemssen. Allen diesen seinen Lehrern ist Verfasser zum grössten Danke verpflichtet.

Thesen.

1. Zur Herstellung einer rationellen künstlichen Säuglingsnahrung muss als wissenschaftliche Grundlage auf die Forschungen der physiologischen Chemie und Bacteriologie zurückgegriffen werden.
2. Die Frage, ob und in wie weit die Zöglinge höherer Lehranstalten durch die an sie gestellten Anforderungen überbürdet sind, erfordert zu ihrer Behandlung dringend exacte objective Messungsmethoden geistiger Ermüdung.
3. Bei Infectionskrankheiten, deren Erreger in den Respirationsorganen sich finden, ist Ansteckung durch Uebertragung feinster von den Patienten ausgestreuter Tröpfchen unter gewöhnlichen Verhältnissen in erster Linie zu fürchten.

Pierer'sche Hofbuchdruckerei Stephan Geibel & Co., Altenburg.